

(19)



KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030095669 A
 (43)Date of publication of application: 24.12.2003

(21)Application number: 1020020033197
 (22)Date of filing: 14.06.2002

(71)Applicant: REXGENE BIOTECH CO., LTD.

(72)Inventor: HWANG, BO SIK
 KIM, CHUN NYEON
 KWON, SEOK HYEONG
 PARK, GI MUN
 PARK, JONG JIN

(51)Int. Cl. A61K 35 /78

(54) ISOFLAVONE OBTAINED FROM NATURAL MATERIAL, PROCESS FOR PREPARING THE SAME, AND THE USE THEREOF

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are isoflavone obtained from natural material, especially *Sophora japonica* L., a process for preparing the same, and the use thereof. The isoflavone prevents aging, alleviates menopause symptoms, and prevents womans diseases, such as breast cancer, and adult diseases. CONSTITUTION: A method for manufacturing isoflavone from *Sophora japonica* L. comprises the steps of: finely pulverizing the flower, leaf, fruit and bark of *Sophora japonica* L., followed by defatting and hot water-extraction; extracting the hot water extract with an organic solvent; and removing proteins by precipitation.



8.288 다이드제인
 9.194 글리시테인
 16.109 제니스테인

copyright KIPO 2004

Legal Status

Date of request for an examination (20020614)
 Notification date of refusal decision (00000000)
 Final disposal of an application (rejection)
 Date of final disposal of an application (20050110)
 Patent registration number ()
 Date of registration (00000000)
 Number of opposition against the grant of a patent ()
 Date of opposition against the grant of a patent (00000000)
 Number of trial against decision to refuse ()
 Date of requesting trial against decision to refuse ()

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 35/78

(11) 공개번호
(43) 공개일자
특2003-0095669
2003년12월24일

(21) 출원번호
(22) 출원일자
10-2002-0033197
2002년06월14일

(71) 출원인
주식회사 렉스진바이오텍
충북 음성군 삼성면 대야리 344

(72) 발명자
권석형
서울특별시서초구서초2동1332우성아파트21-1105

김춘년
경기도수원시권선구금곡동LG빌리지304-701

박기문
경기도안양시동안구비산3동341뉴타운아파트17-1302

박종진
경기도수원시장안구조원동조원주공아파트216-1503

황보식
경기도수원시권선구금곡동LG빌리지212-2002

(74) 대리인
김석현
이희숙

심사청구 : 있음

(54) 천연물로부터 수득된 이소플라본, 그의 제조 방법 및 용도

요약

본 발명은 콩과의 낙엽교목인 회화나무의 꽃봉오리 말린 것(괴화), 잎(괴엽), 열매(괴각자), 나무껍질(괴백피) 및 열매 껍질에 다량으로 함유되어 있는 회화나무 이소플라본의 제조 및 이용에 관한 것으로, 보다 상세하게는 뼈의 노화를 방지하고 갱년기장애를 완화시키며 유방암 등 여성 특유의 질환을 예방하며, 또한 각종 생활 습관에 의해 발생하기 쉬운 성인병 질환을 예방하기 위한 에스트로젠 유사물질인 회화나무 이소플라본을 제조하는 방법 및 이의 식품 첨가물로서의 용도에 관한 것이다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 실시예 2의 표준 이소플라본의 HPLC분석도이다.

도 2는 회화에서 추출한 이소플라본의 HPLC분석도이다.

도 3은 회각자에서 추출한 이소플라본의 HPLC분석도이다.

도 4는 회엽에서 추출한 이소플라본의 HPLC분석도이다.

도 5는 회백피에서 추출한 이소플라본의 HPLC분석도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 회화나무의 각 부위로부터 이소플라본을 제조하는 방법, 및 상기 수득된 이소플라본의 이용에 관한 것이다.

콩에는 에스트로젠(estrogen)과 유사한 작용을 하는 파이토에스트로젠 (phytoestrogen)이 다량 함유되어 있다(Nutrition and Cancer, 26, 1996, Reinli 와 Block). 파이토에스트로젠은 동물사료에 의한 불임동물의 생성으로 발견하게 된 것으로(Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 208, 1995, Franke등), 알팔파, 완두콩, 오트밀, 팥, 대두 및 쌀 등 많은 곡식물에 함유되어 있으며, 이소플라본(isoflavone)계 파이토에스트로젠은 콩과(Leguminosae)에 특히 많이 함유되어 있다. 그 대표적인 성분이 다이드진(daidzin), 글리스틴(glycitin), 그리고 제니스틴(genistin) 등이며, 동물실험이나 생체외(in vitro)실험에서 암세포의 성장을 억제하는 것이 확인되어 있다. 또한 이들 중 어글리콘(aplycons)형 이소플라본인 다이드제인(daidzein)과 제니스테인(genestein)은 에스트로젠보다 친화력은 낮지만 에스트로젠 수용체에 결합하여 에스트로젠 대체물질로 각광을 받고 있다(Mol. Biol., 49, 1994, Milksicek).

성호르몬인 에스트로젠과 유사한 역할을 하는 이소플라본은 식물성 에스트로젠으로 잘 알려져 있으며, 암세포 증식 매개효소의 작용을 저해하거나, 에스트로젠 수용체와 결합하여 세포증식 작용에 관여하며, 또한 폐경기 여성 질환인 골다공증 억제 및 정신적 안정감을 부여하는 성분이다.

일반적으로 이소플라본은 에스트로젠 수용체와 결합하여 세포증식 작용에 관여하며, 폐경기 여성의 골다공증 억제와 정신적 안정감을 주는데 작용하는 것으로 알려져 있다. 이소플라본의 주요 성분들은 당을 갖고 있는 배당체의 구조를 갖고 있으며, 이 배당체(glycoside)는 위나 장에서 당이 떨어진 어글리콘(aglycon)의 형태로 변화하며, 어글리콘화한 구조를 갖고 있는 것이 그 흡수력이 뛰어나 강한 생리작용을 하는 것으로 보고되고 있다(J. Nutr., 126, 1995, Roger). 또한 저밀도 지단백의 농도를 저하시키는 효력도 제니스틴의 어글리콘인 제니스테인이 강하며(Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17, 1997, Kapiotis), 혈장에 대한 활성도 어글리콘이 강한 것으로 알려져 있다(J.Nutr., 130, 2000, Izumi). 이소플라본의 배당체와 어글리콘의 항암활성을 조사한 결과, 어글리콘의 항암효과가 매우 탁월한 것으로 알려져 있다(표 1).

표 1. 이소플라본 배당체와 어글리콘의 항암효과

IC50 (ug/ml)	어글리콘		배당체	
	제니스테인	다이드제인	제니스틴	다이드진
HCC-44B2 (대장암)	10.5	-	35.0	-
MDA-468 (유방암)	5.5	37.5	>100	>100
MCF-7 (유방암)	12.50	27.4	>100	>100
HSC-45M2(위암)	8.5	-	17.5	-

IC50 : 50%이상의 암세포를 죽이는데 필요한 최소농도

(인용 : Cancer Research, 53, 1993, Numoto)

이와 같이 파이로에스트로젠 활성을 갖고 있는 성분들을 생산하여 식품으로 이용한다는 것은 그 산업적 기대효과 뿐만 아니라 국민 보건에 미치는 효과도 매우 지대하다.

지금까지 이소플라본과 관련된 특허 상황을 살펴보면, 대부분이 콩에서 이소플라본을 추출하거나 조제하는 방법이다.

대두 배아로부터 생리활성 물질인 이소플라본의 분리정제방법(특2001-0016220)의 경우, 대두를 건조시켜 배아를 분리하고, 분리된 배아에서 이소플라본을 정제하는 것이며, 대두 배아로부터 발효를 통한 고순도 이소플라본아글리콘의 생산방법(특2002-0032078)의 경우도 대두 배아를 이용하는 생산방법이다. 또한, 개선된 이소플라본 추출 방법(특2001-0089863)의 경우, 콩 추출액을 산성화한 다음, 슬러지와 분리하여 흡착성 수지가 충전된 칼럼에 통과시켜, 추출액 중의 이소플라본을 상기수지에 흡착시키는 것을 골자로 하고 있다. 콩배아 및 콩배아와 두부 순물의 혼합액으로부터 열수추출에 의한 이소플라본의 분리방법(특2001-0060419)은 콩 배아로부터 열수추출에 의해 이소플라본을 간편하게 분리하거나, 이소플라본 중의 제니스테인 유도체를 보다 많이 얻기 위해 콩 배아와 두부 순물을 혼합하여 이소플라본을 분리하는 방법에 관한 것이다.

콩 이외의 천연물로부터 이소플라본을 정제하여 이용한 것은 골다공증 예방 및 치료에 효과를 갖는 갈근 추출물의 경우(특2002-0002353)와 황기 유래의 이소플라본을 함유하는 간기능 개선제(특1998-048620)등에 지나지 않는다. 이와 같이 현재 식품 첨가물로 이용되고 있는 이소플라본은 모두 콩을 주원료로 하고 있으며, 콩 이외 다량의 이소플라본이 함유되어 있다는 보고는 거의 없는 실정이다.

이와 같이 콩에서 이소플라본을 정제하거나 생산하기 위한 방법에 관한 연구는 매우 활성화되어 있으나, 콩이 아닌 다른 식물에서 이소플라본을 탐색하고, 거기에 함유되어 있는 이소플라본을 정제하여 이용하기 위한 연구는 거의 진행되고 있지 않은 상황에서, 본 발명자들은 이소플라본의 이용 가치를 극대화시키고 자생식물의 보존과 농가소득 극대화를 도모하기 위하여 이소플라본을 다량으로 함유하고 있는 천연물을 검색한 결과, 콩과식물인 회화나무(*Sophora japonica*)에 다량의 이소플라본이 함유되어 있는 것을 발견하였다.

회화나무의 각 부위별 명칭은 모두 상이하여, 꽃봉오리 말린 것을 회화(피화), 잎을 회엽(피엽), 열매를 회각자(피각자), 나무껍질을 회백피(피백피)라고 한다. 동의보감에 의하면, 회화나무의 어린잎은 식용으로 차의 대용품으로 쓰며, 약으로 쓸 때는 탕으로 하거나 환제, 산제로 하여 사용한다고 되어 있다. 열매는 쌀뜨물 또는 식초에 하루밤 재워 증기에 찌서 불에 말려 두고 사용한다. 꽃은 볶아서 사용하며, 줄기는 햇볕에 말려 두고 쓴다. 회화나무에는 루틴이나 제니스테인 등이 함유되어 있으며, 항염증, 피부가려움증, 지혈, 항히스타민제로 민간에서 이용되어 오는 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명은 민간요법에서 이용되고 있는 천연물인 회화나무의 각 부위(꽃, 열매, 잎, 나무껍질)로부터 이소플라본을 효과적으로 생산하기 위한 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

본 발명의 또 다른 목적은 회화나무의 각 부위별로 함유되어 있는 이소플라본을 효과적으로 추출하여 이를 효과적으로 이용하고자 하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 파이토에스트로젠 활성이 강하여 골다공증 예방에 효과적인 제니스테인을 이용한 건강보조식품이나 특수 영양식품을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명에 따르면, 회화나무의 각종 부위(꽃, 열매, 잎, 나무껍질)를 열수, 에탄올, 메탄올, 헥산, 이소프로필알콜, 아세톤 등의 용매로 추출하여 이소플라본을 수득하고, 그 조성 성분의 효과를 실험으로 입증하였다.

본 발명의 바람직한 방법에 따르면, 건조한 회화, 회엽, 회각자, 회백피를 분쇄기로 분쇄한 것을 탈지한 후, 시료를 농축·건조한다. 바람직하게는, 상기 분쇄한 분말을 탈지하기 전에 100-250 메쉬 체에 통과시킨다. 건조물과 물을 1:2 ~ 1:10의 비율로 혼합한 후, 50 - 150℃에서 10분 내지 6 시간 동안 가열 추출한 다음, 이 열수 추출액의 1~100배의 유기 용매를 첨가하여 실온(24시간), 또는 35~80℃(0.5~24시간)에서 각각 교반한다. 이 혼합물을 초음파기로 30분간 처리한 후, pH를 3.8 - 4.7로 낮추어 단백질을 침전, 제거하며 어글리콘화를 유도한다. 이소플라본 추출액을 5

~100배 농축시킨 후, 흡착용 수지를 사용하여 흡착크로마토그래피를 실시하여 이소플라본을 흡착, 분리시킨다.

본 발명에 따르면, 회화나무의 각 부위에서 이소플라본을 효과적으로 추출하고, 또한 어글리콘을 쉽게 조제할 수 있으며, 상기 수득된 이소플라본의 성능과 효과를 이용한 의약품 또는 식품 조성물을 제조할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예를 들어 상세히 설명하나, 본 발명이 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

분쇄기로 미세하게 분쇄하여 200mesh 여과망으로 여과한 회각자 1kg에 물 500ml와 헥산 3ℓ 를 첨가하여 60분간 교반시켰다. 이 혼합물을 10분간 방치하거나 원심분리(3,000rpm/10min)를 통하여 헥산층을 제거하는 방법으로 회각자의 지질을 제거하였다. 탈지한 회각자 용액에 물 4.5ℓ 를 첨가한 후 30분간 오토클레이브에서 살균처리하였다. 시료 용액에 99% 에탄올 15ℓ 를 첨가하여 실온에서 4시간 교반한 후, 30분간 초음파 처리하여 회각자에 함유되어 있는 이소플라본을 추출하였다.

상기와 같이 얻어진 이소플라본 함유액의 pH를 4.5로 조절하여 단백질을 침전시킨 후, 100% 메탄올로 활성화시킨 Amberlite XAD-1180 수지에 이소플라본만 흡착시켰으며, 흡착된 이소플라본을 80% 에탄올로 유리시킨 후, 농축, 동결건조하였다.

실시예 2

회화, 회엽, 그리고 회백피도 실시예 1과 동일한 방법으로 이소플라본을 추출하였으며, 동일한 방법으로 흡착 크로마토그래피에 의해 추출용액 중에 함유되어 있는 이소플라본을 정제하였다. 실시예 1, 2, 3에 의해 생산된 이소플라본의 함량을 계산한 결과, 회각자에 약 0.14%, 회화에 약 0.09%가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 또한 회엽 및 회백피에도 비교적 많은 량의 이소플라본이 함유되어 있는 것으로 나타나, 회화나무의 각 부위를 이용한 이소플라본의 생산 방법을 정립하는 것이 매우 중요하리라 생각된다.

표 2. 이소플라본의 함량(g)

회화나무 부위	총 이소플라본	제니스테인	다이드제인	글리시테인
회화	0.92	0.42	0.35	0.15
회엽	0.35	0.05	0.17	0.13
회백피	0.21	0.03	0.11	0.09
회각자	1.43	1.35	0.05	0.03

실시예 3

한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 WiDr (KCLB 10218), A498 (30044), HeLa (10002), MKN45 (80103), 그리고 MCF-7(30022) 세포는 10%(v/v) FBS와 항생제(페니실린, 100unit/스트렙토마이신, 100mg/ml)를 함유하는 DME M 및 RPMI1640 배지(pH 7.2)를 사용하여 5% CO₂ 항온조(37℃)에서 배양하면서 각종 암세포에 대한 회각자 이소플라본의 항암효과를 조사하였다(Tweentyman, P. R. and Lucombe, M., *Br J cancer.*, 1987). 유방암 세포주인 MCF-7의 경우 0.1mg/ml에서 94% 세포독성이 있는 것이 확인되었으며, 자궁암 세포주인 HeLa에 대해서는 88% 세포성장을 억제하는 것으로 나타났다. 신장암 세포주인 A498은 82%, 대장암 세포주인 WiDr은 87%, 위암 세포주인 MKN-45은 71%의 강한 암세포 성장 억제효과가 있는 것으로 나타났다(표 3). 이는 회화나무 이소플라본이 콩에서 추출한 이소플라본과 거의 동일한 효과를 나타내어 이를 식품에 이용할 경우 강한 항암 활성을 나타낼 수 있음을 보여준다.

표 3. 회각자 이소플라본에 의한 각종 암세포에 대한 세포독성

세포주	농도 (mg/ml)	세포독성 (%)
HeLa	0.001	58.59± 4.56
	0.01	72.49± 3.78
	0.1	88.32± 2.48

MCF-7	0.001	70.46± 3.66
	0.01	91.19± 2.98
	0.1	94.04± 2.47
WiDr	0.001	63.76± 2.33
	0.01	79.39± 3.14
	0.1	87.21± 2.71
A498	0.001	48.49± 2.31
	0.01	77.17± 2.55
	0.1	82.75± 1.97
MKN-45	0.001	44.43± 3.12
	0.01	62.18± 2.81
	0.1	71.32± 2.63

1) 세포독성 (%) ± 표준편차. 세포독성은 이소플라본에 의해 성장이 저해된 정도임. 각 결과는 12회 반복 분의 결과를 분석한 것임.

발명의 효과

본 발명에 따르면, 항암활성 등의 우수한 생리활성기능을 갖고 있는 이소플라본을 회화나무의 각 부분에서 용이하게 경제적으로 추출, 제조하는 방법이 제공되며, 상기 수득된 이소플라본은 의약 조성물 및 예방의학의 일환으로 최근 소비량이 급증하고 있는 건강보조식품 및 의약 조성물의 원료로서 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

회화, 회엽, 회각자 또는 회백피에서 선택된 회화나무의 각 부위를 분쇄기로 미세하게 분쇄하고, 탈지하여 열수 추출한 추출물을 다시 유기 용매로 추출하고 단백질을 침전제거하는 과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 이소플라본의 제조 방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 분쇄된 회화나무 각 부위의 분말을 100~250mesh 스크린망으로 여과하고, 탈지하여 추출할 때, 50~150℃의 물로 10분~6시간 동안 스팀가열하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 탈지한 분말을 열수 추출한 후 유기 용매로 추출할 때, 에탄올, 메탄올, 이소프로필알콜, 헥산 및 아세톤으로 구성된 군에서 선택된 1 - 100 배의 유기용매로 35~70℃에서 0.5~24시간 동안 추출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 유기 용매 추출 시에 초음파기를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 탈지한 분말을 초임계추출법으로 추출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 단백질을 제거하기 위해 pH를 3.8~4.7 로 조절하는 것을 특징으로 하는 방법.

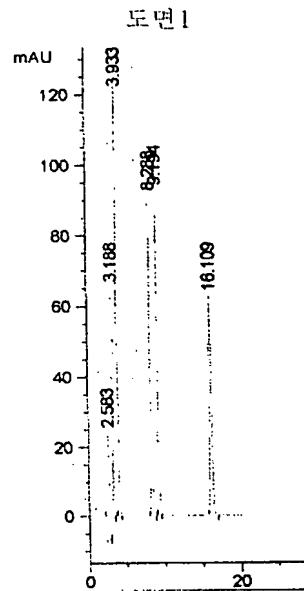
청구항 7.

회화, 회엽, 회각자 또는 회백피에서 선택된 회화나무의 각 부위를 분쇄기로 미세하게 분쇄하고, 탈지하여 열수 추출한 추출물을 다시 유기 용매로 추출하고 단백질을 침전제거하여 수득한 이소플라본을 함유하는 항암제.

청구항 8.

회화, 회엽, 회각자 또는 회백피에서 선택된 회화나무의 각 부위를 분쇄기로 미세하게 분쇄하고, 탈지하여 열수 추출한 추출물을 다시 유기 용매로 추출하고 단백질을 침전제거하여 수득한 이소플라본을 함유하는 건강보조식품.

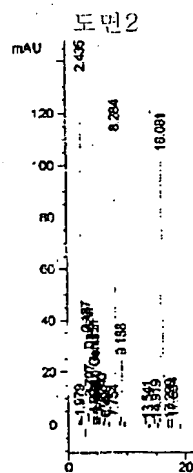
도면

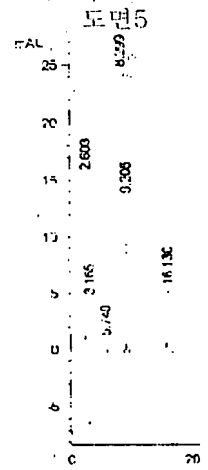
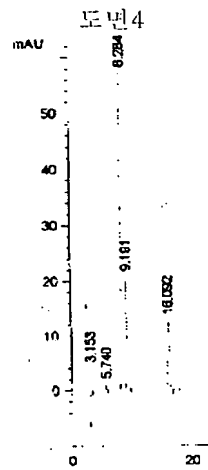
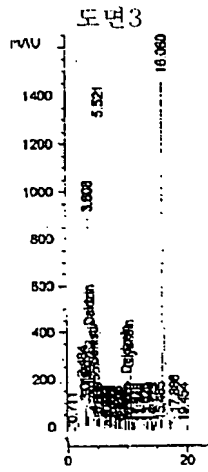


8.288 다이드제인

9.194 글리시테인

16.109 제니스테인





BEST AVAILABLE COPY